

学校编码: 10384

学 号: 21620101152334

分类号_____密级_____

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

东太平洋深海热液区沉积物中微生物多样性研究及一株深海嗜热厌氧细菌的分类鉴定

Diversity of deep-sea hydrothermal vent sediment microorganism
and Classification of a thermophilic anaerobic strain in the
Eastern Pacific Ocean

谢运标

指导教师姓名: 邵宗泽 研 究 员

周梅先 副研究员

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2013 年 05 月

论文答辩时间: 2013 年 06 月

学位授予日期: 2013 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2013 年 06 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人提交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。
本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以适当的方式明确标明。并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外，该学位论文为（ ）课题（组）的研究成果，获得（ ）课题（组）经费或实验室的资助，在（ ）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用学位论文并向主管部门或其指定机构送交论文（纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其他方式合理复制学位论文。

本学位论文属于

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

目 录.....	1
CONTENTS	IV
摘 要.....	I
ABSTRCT	I
第一章 绪论	1
1 太平洋环境概述.....	1
1.1 地理位置环境	1
1.2 生态环境概述	1
2 深海热液区概述.....	3
2.1 深海热液活动	3
2.2 深海热液区生态系统.....	4
2.3 深海热液区微生物多样性.....	7
2.4 深海嗜热微生物概述.....	8
3 热液区铁还原微生物的研究.....	10
3.1 铁还原微生物的主要分类.....	10
3.2 铁还原的主要机制.....	12
4 深海沉积物微生物多样性研究.....	12
4.1 传统微生物学研究方法.....	12
4.1.1 原位培养法	13
4.1.2 纯培养法	13
4.2 微生物分子生物学研究方法	14
4.2.1 核糖体 RNA 编码基因.....	15
4.2.2 环境基因组技术.....	16
4.2.3 DAPI 显微镜计数技术.....	16
4.2.4 荧光原位杂交.....	17
4.2.5 流式细胞技术.....	17
4.2.6 实时定量 PCR(real-time PCR)	18
4.2.7 变性梯度凝胶电泳.....	18
4.2.8 限制性酶切片段长度多态性	19
4.2.9 限制性酶切末端片段长度多态性法.....	19
4.2.10 单链构象多态性法.....	20

5 本论文研究的目的及意义	20
第二章 东太平洋热液区微生物多样性研究	23
1 材料与方法.....	23
1.1 实验材料.....	23
1.1.1 样品的采集与处理.....	23
1.1.2 菌株与质粒	24
1.1.3 主要试剂	24
1.1.4 主要仪器	24
1.1.5 培养基	25
1.1.6 溶液.....	26
1.1.7 分析软件	27
1.1.8 引物序列	27
1.2 实验基本方法	28
1.2.1 土壤环境总 DNA 的提取.....	28
1.2.2 总 DNA 的纯化	28
1.2.3 菌落 PCR.....	29
1.2.4 PCR 反应体系及条件	29
1.2.5 PCR 产物的纯化	29
1.2.6 TA 克隆	29
1.2.7 E.coli 感受态制备及质粒转化	30
1.2.8 外源片段的插入检测	30
1.2.9 RFLP 多态性分析, 统计 OTU.....	31
1.2.10 克隆序列的测定与分析	31
2 实验结果与分析.....	33
2.1 S005 站位样品的总 DNA 的提取	33
2.2 细菌和古菌 16S rDNA 序列扩增	33
2.3 细菌和古菌 16S rDNA RFLP 分析	34
2.4 16S rDNA 基因克隆文库的评估	35
2.5 S005-TVG1 站位沉积物微生物多样性分析和分布情况	36
2.5.1 16 S rDNA 基因型所属类群分布情况	36
2.5.2 S005 站位代表性菌株营养代谢类型情况	38
2.5.3 S005-TVG1 站位微生物多样性及系统发育分析	38
3 讨论与结语.....	45
3.1 深海热液区沉积物总 DNA 的提取	45
3.2 PCR 16S rDNA	46
3.3 深海热液区沉积物微生物文库的分析	46
第三章 热液区沉积物铁还原菌多样性及一株嗜热厌氧菌株的分离及鉴定.....	48

1 实验材料和方法	48
1.1 样品的采集与处理	48
1.2 基本培养基	48
1.3 菌株的富集及分离纯化	51
1.3.1 培养基的厌氧处理	51
1.3.2 铁还原菌株的富集	51
1.3.3 单克隆菌株的分离及纯化	52
1.4 菌体形态观察	52
1.5 富集产物总 DNA 的提取及纯化	52
1.6 菌体生长曲线的测定	53
1.7 纯菌株的生理生化特性测定	53
1.7.1 温度生长范围的测定	53
1.7.2 盐度生长范围的测定	53
1.7.3 酸碱度生长范围的测定	54
1.7.4 代时的计算	54
1.7.5 菌株耐热性及孢子的检测	54
1.7.6 菌株抗生素敏感性的检测	54
1.7.7 菌株对碳源或氮源的利用情况的检测	54
1.7.8 电子受体生长影响的检测	55
1.7.9 菌株基因组 DNA 中 G+C mol% 含量的测定	55
2 实验结果与分析	57
2.1 深海沉积物样品中铁还原菌的富集结果及多样性分析	57
2.1.1 深海沉积物样品铁还原微生物富集结果	57
2.1.2 富集产物总 DNA 的提取	57
2.1.3 富集产物 16S rDNA 序列扩增	58
2.1.4 所测得序列与已知序列比对结果	58
2.1.5 嗜热铁还原菌系统发育分析	59
2.1.6 铁还原菌富集产物讨论	61
2.2 一株严格厌氧嗜热菌株 <i>Caloranaerobacter</i> sp. TR13 的描述	61
2.2.1 形态特征分析	61
2.2.2 生理生化特征分析	62
2.2.3 基于 16S rDNA 的分子进化分析	66
2.2.4 G+C mol% 含量分析	68
2.2.5 讨论	68
2.2.6 <i>Caloranaerobacter</i> sp. TR13 作为新种的描述	69
第四章 总结	71
参考文献	73
致谢	84

CONTENTS

ABSTRACT	I
ABSTRACT	I
Chapter I Introduction	1
1 Pacific Environment Overview	1
1.1 geographical Environmental.....	1
1.2 Ecological Environment Overview	1
2 Deep-sea hydrothermal area Overview	3
2.1 Deep-sea hydrothermal activity.....	3
2.2 Deep-sea hydrothermal ecosystem	4
2.3 Deep-sea hydrothermal field microbial diversity	7
2.4 Deep-sea thermophilic microorganisms Overview.....	8
3. Hydrothermal field iron-reducing microorganisms	10
3.1 Iron-reducing microorganisms classification	10
3.2 Iron reducing microorganisms mechanism	12
4 Deep-sea sediment microbial diversity	12
4.1 Traditional microbiology methods.....	12
4.1.1 In situ culture method.....	13
4.1.2 Pure culture	13
4.2 Microbial Molecular Biology Research Methods.....	14
4.2.1 Ribosomal RNA gene encoding	15
4.2.2 Environmental genome technology.....	16
4.2.3 DAPI microscope counting technique.....	16
4.2.4 Fluorescence in situ hybridization	17
4.2.5 Flow cytometry	17
4.2.6 Real-time quantitative PCR (real-time PCR)	18
4.2.7 Denaturing gradient gel electrophoresis	18
4.2.8 Restricted fragment length polymorphism	19
4.2.9 Restriction terminal fragment length polymorphism method.....	19
4.2.10 Single-strand conformation polymorphism method.....	19
5 The purpose and significance of the thesis.....	20

Chapter II the studis of the microorganism diversity in the eastern

Pacific hydrothermal vent.....	22
1 Materials and Methods.....	22
1.1 Materials.....	22
1.1.1 Sample collection and processing	22
1.1.2 Bacterial strains and plasmids.....	23
1.1.3 Reagents and solution.....	23
1.1.4 Instruments	23
1.1.5 Medium.....	24
1.1.6 Solutions	25
1.1.7 Analysis Software	26
1.1.8 Primer sequences.....	26
1.2 Experimental methods.....	27
1.2.1 Soil environmental DNA extraction.....	27
1.2.2 Purification of total DNA	27
1.2.3 Colony PCR	27
1.2.4 PCR reaction system and conditions.....	28
1.2.5 PCR product purify	28
1.2.6 TA clone.....	28
1.2.7 E. coli competent Preparation and Transformation.....	29
1.2.8 The detection insertion of foreign fragment	29
1.2.9 16S rDNA the library clones RFLP polymorphism analysis, statistics OTU	30
1.2.10 Clone sequence determination and analysis	30
2 Results and Analysis	31
2.1 S005 stations sample DNA extraction	31
2.2 Bacterial and archaeal 16S rDNA sequence amplification	31
2.3 Bacterial and archaeal 16S rDNA RFLP analysis	32
2.4 16S rDNA gene clone library assessment	33
2.5 S005 stations sediment microorganism diversity and distribution	34
2.5.1 16 SrDNA genotype respective population	34
2.5.2 Typical strains of nutritional and metabolic type.....	36
2.5.3 S005-TVG1 stations microbial 16SrDNA of cloning phylogenetic tree...	44
3 Discussion and Conclusion	44
3.1 Deep-sea hydrothermal sediments of DNA extraction	44
3.2 PCR 16S rDNA	45
3.3 Deep-sea hydrothermal field analysis of the sediment microbial library	45

Chapter III Iron-reducing bacteria diversity and the isolation and

identification of an anaerobic thermophilic strains.....47

1 Materials and methods 47

1.1 Sample collection and processing..... 47

1.2 Basic medium 47

1.3 Enrichment and separation and purification of the Strain..... 50

1.3.1 Anaerobic treatment of the medium 50

1.3.2 The enrichment of the iron-reducing strains..... 50

1.3.3 Isolation and Purification 51

1.4 Observe cell morphology 51

1.5 DNA extraction and purification 51

1.6 Determination of cell growth 52

1.7 Determination of Physiological and biochemical characteristics of the pure strains..... 52

1.7.1 Determination of temperature range 52

1.7.2 Determination of the salinity growth range 52

1.7.3 Determination of pH growth range 53

1.7.4 Calculation of the generation time 53

1.7.5 Isolation heat-resisting and spores detection 53

1.7.6 Antibiotic sensitivity of detection 53

1.7.7 Determination of carbon or nitrogen source utilization 53

1.7.8 The effect of the electron acceptor for strain growth 54

1.7.9 Determination of the G+ C mol% 54

2 Results and analysis..... 55

2.1 The diversity of iron-reducing bacteria in deep-sea sediment samples 55

2.1.1 Iron-reducing microorganism enrichment results 57

2.1.2 Total DNA extraction 58

2.1.3 Amplified 16S rDNA sequence..... 58

2.1.5 Thermophilic iron-reducing bacteria phylogenetic analysis..... 59

2.1.6 Discussion about the iron-reducing bacteria enriched product..... 51

2.2 Describe a strictly anaerobic thermophilic strains *Caloranaerobacter* sp.TR13 . 61

2.2.1 Morphological features..... 61

2.2.2 Physiological and biochemical characteristics 62

2.2.3 16S rDNA-based molecular evolutionary analysis 66

2.2.4 G+C mol 68

2.2.5 Discussion..... 68

2.2.6 The description of *caloranaerobacter* sp.TR13 as new species 69

Chapter IV Summary 71

References	73
-------------------------	-----------

Acknowledge	84
--------------------------	-----------

厦门大学博硕士论文摘要库

摘要

东太平洋深海海底热液系统自被发现以来,其热液口处独特的极端生活环境及微生物独特的生理生化特征成为科学家们一直研究的前沿热点区域。对东太平洋深海热液区沉积物中微生物的研究,不仅有助于我们认识热液区未知生物类群的功能和理解微生物对热液生态系统的影响,而且对东太平洋热液区微生物菌种资源开发、新的铁还原菌株的筛选以及揭示微生物在深海热液环境金属元素循环过程中的作用,都具有十分重要的意义。

本实验以研究东太平洋深海热液区微生物多样性、铁还原微生物多样性以及新的菌种资源为主要目的。采取分子生物学方法(PCR-RFLP),以 16S rRNA 基因序列为基础分析沉积物中微生物菌株间的系统发育关系,对东太平洋热液区 S005-TVG1 站位样品进行了研究;采取羟基氧化铁(FeOOH)液体培养基对 S019(W102.55°, S3.10°, 2891m)、S024(W102.55°, S3.10°, 2906m)两个站位沉积物样品中的铁还原细菌进行了富集,分别研究了铁还原细菌多样性和完成了一株嗜热厌氧细菌新种的鉴定。主要结果如下:

1. 对 S005-TVG1 站位热液区沉积物样品中的微生物多样性进行了研究,结果表明:1) 所有细菌克隆子分属 14 个不同类群,分别是 γ -Proteobacteria (39.47%)、 α -Proteobacteria(15.78%)、Planctomycetes(6.57%)、 β -Proteobacteria(3.94%)、 ζ -Proteobacteria(2.63%)、Acidobacteria(3.94%)、Firmicutes (1.31%)、Actinobacteria (1.31%)、Spirochaetes (1.31%)、Gemmatimonadetes (3.94%)、Nitrospirae (2.63%)、 δ -Proteobacteria(6.57%)、Chloroflexi(1.31%)和 Chlorobi(2.63%)。其中 γ -Proteobacteria 属于优势菌群,次优势菌群为 α -Proteobacteria 和 δ -Proteobacteria, Planctomycetes 也有较多的分布。NCBI 比对结果还表明,从该站位样品中得到的与数据库中已知克隆子序列相似性小于 97% 的细菌克隆子所占比例为 85.87%,显示该站位沉积物中存在大量未知细菌类群;2) 实验得到的古菌克隆子可划分为 3 个类群,泉古菌门(Crenarchaeota)为优势菌群,占 30.16%;其次是奇古菌门(Thaumarchaeota),占 22.45%;广古菌门(Euryarchaeota)占 13.2%;其他为未分类的古菌(Unclassified

archaeon)，占 35.7%。结果表明，此站位古菌克隆子全部为未培养克隆子。

2. 对热液区 S019 站位的硫化物样品中铁还原细菌进行了研究，结果表明：铁还原细菌多样性较低，且所得克隆子都属于厚壁菌门，与已分离鉴定的菌株 *Carboxydocella* sp.SLM61、*Moorella* sp.64_FGQ、*Moorella* sp. KKC1 和 *Desulfitibacter alkalitolerans* sk.kt5 的相似度都比较低（<97%），由此可知该站位存在着可分离出可培养的微生物新种或新属的潜力。

3. 从 S024 站位热液区沉积物样品中分离出一株嗜热厌氧细菌 *Caloranaerobacter* sp.TR13，菌株 TR13 的 16S rDNA 序列与 *Caloranaerobacter azorensi* MV1087 的 16S rDNA 序列具有 97% 的相似性。菌株 TR13 是一株严格厌氧嗜热细菌，细胞呈长杆状，革兰氏阴性，无孢子生成，菌体大小为 $4.0-10.0\mu\text{m}\times 0.3-0.5\mu\text{m}$ ，端生鞭毛，具游动性，细胞呈单个、成对或成串排列（4-5 个细胞）。菌株 TR13 温度生长范围为 35-65℃，最适生长温度为 60℃；pH 生长范围为 6.0-8.0，最适 pH 值为 6.5；盐度生长范围为 0.5-7.0%，最适生长盐度为 3.0-4.0%。菌株 TR13 对氨苄青霉素、利福平和氯霉素敏感，对卡那霉素和链霉素有抗性。菌株 TR13 在最适生长条件下，最短生长代时为 42min，最大细胞浓度可达到 $8\times 10^8\text{cells/mL}$ 。菌株 TR13 异养生长，可以利用蛋白质类、胰蛋白胨、酵母膏、丙酮酸钠、植物大豆蛋白等。菌株 TR13 可还原羟基氧化铁，不能利用硝酸盐、亚硝酸盐和亚硫酸钠作为电子受体。菌株 TR13 基因组 DNA G+C mol% 含量为 32.80%，16S rDNA GenBank 序列号为 KC533829。

关键词：深海热液区；RFLP；微生物多样性；嗜热厌氧；*Caloranaerobacter* sp.TR13

ABSTRACT

Since the deep-sea submarine hydrothermal systems were found in the eastern Pacific The unique extreme life environment and unique physiological and biochemical characteristics of the hydrothermal vents has been a research hot-spot studied by scientists nowadays. Not only the research of the microorganisms in the eastern Pacific deep-sea hydrothermal sediments help us to understand the function and the effect on the hydrothermal ecosystems of unknown organisms, But also has a very important significance for developing microbial resources in the eastern Pacific hydrothermal, screening the new iron-reducing strains and understanding and revealing that what the microorganisms play role in the metal elements recycling process in deep-sea hydrothermal environment.

The primary purpose of this experiment is to study the microbial diversity and iron-reducing microbial diversity as well as identify a new strains screened from deep-sea hydrothermal area in the eastern Pacific. For the sediment in the S005-TVG1 station.we analysed the phylogenetic relationships between the microbial strains based on 16S rRNA gene sequence by molecular biological methods (PCR-RFLP).And for the other two samples from the S019 (W102.55 °, S3.10 °, 2891m) and S024 (W102.55 °, S3.10 °, 2906m) stations, Separately, we studied the iron-reducing diversities of the bacteria enriched with the fluid medium contains FeOOH and identified a new specie. The main results as follows :

1. The sample of S005-TVG1 stations hydrothermal Area was studied.the results as follows:1) Bacterial clones belong to 14 different groups. Separately, they are: γ -Proteobacteria (39.47%); α -Proteobacteria(15.78%); Planctomycetes(6.57%); β -Proteobacteria(3.94%); ζ -Proteobacteria(2.63%); Acidobacteria(3.94%); Firmicutes (1.31%); Actinobacteria(1.31%); Spirochaetes(1.31%); Gemmatimonadetes(3.94%); Nitrospirae(2.63%); δ -Proteobacteria(6.57%); Chloroflexi(1.31%); Chlorobi(2.63%) in which gamma-Proteobacteria belong to the dominant group and then

α -Proteobacteria, δ -Proteobacteria, Planctomycetes. The results from NCBI Blast also showed that the similarity of this stations clones sequence with the database known clones sequence less than 97%, and the proportion about 85.87%. we can know that there are a large number of unknown bacterial groups in this station; 2) Archaea clones were divided into three groups, Separately, they are Crenarchaeota which was the dominant groups, account for 30.16%, followed, Thaumarchaeota, account for 22.45%, Euryarchaeota 13.2%, other Unclassified archaeon 35.7% . All archaeal clones were uncultured strains.

2. The sample of S019 stations hydrothermal Area was studied. The results show that the diversity of iron-reducing bacteria were very low, and All clones belonged to Firmicutes, and the similarity of the archae clones with the identified strains: Carboxydocella sp.SLM61 Moorella sp.64_FGQ Moorella sp.KKC1 Desulfitibacter similarity alkalitolerans strain sk.kt5 less than 97%. We can know that there have a great potential to isolate cultivate new species.

3. A new bacteria specie was isolated from the S024 stations hydrothermal Area sediment samples which has a similarities 97% with Caloranaerobacter azorensi. Cloranaerobacter sp. TR13 is a strictly anaerobic thermophilic bacteria, rod-shaped, Gram-negative, no spore-generation, the cell size of $4.0\text{-}10.0\mu\text{m} \times 0.3\text{-}0.5\mu\text{m}$, side flagella, motility, The cells appeared singly, in pairs or in short chains (fewer than five cells). Growth was observed from 37 to 65 °C and the optimum temperature for growth was around 60 °C; Growth from pH 6.0 to 8.0 and the optimum pH was around 6.5; Salinity range of 0.5%-7.0%, and the optimum growth salinity was 3.0-4.0%; Cloranaerobacter sp. TR13 was sensitive to ampicillin, rifampicin, chloramphenicol, and was resistant to kanamycin, streptomycin. With the optimum growth conditions, the shortest growth time was 42min, and the maximum cell concentration reached $8 \times 10^8 \text{ cells/mL}$. For strain heterotrophic growth with proteins, tryptone, yeast extract, sodium pyruvate, Plants soy protein. it could reduct FeOOH solutions and could not use the soluble ferric chloride or ferric nitrate as electron acceptor. The G+ C mol% content is 32.80%. The Genbank number is KC533829.

Keywords: Deep-sea hydrothermal vent ; RFLP ; microbial diversity ; anaerobic
thermophilic *Cloranaerobacter* sp.TR13

厦门大学博硕士论文摘要库

第一章 绪论

1 太平洋环境概述

1.1 地理位置环境

太平洋是世界上最大的海洋，覆盖着地球约 32% 的总面积以及约 46% 的水面。跨度从南极大陆海岸延伸至白令海峡，西面为大洋洲、亚洲，东面则为美洲，跨越 135° 纬度，南北宽度达到 15500 公里。包括属海的面积为 18134.4 万平方公里，不包括属海的面积为 16624.1 万平方公里。面积超过地球陆地面积的总和。太平洋平均深度(不包括属海)4280 米，其最大深度 11034m，为各大洋之最。北部以宽仅 102 公里的白令海峡为界，东南部经南美洲的火地岛和南极洲葛兰姆地(Graham Land)之间的德雷克(Drake)海峡与大西洋沟通；西南部与印度洋的分界线为：从苏门答腊岛经爪哇岛至帝汶岛，再经帝汶海至澳大利亚的伦敦德里(Londonderry)角，再从澳大利亚南部经巴斯海峡，由塔斯马尼亚岛直抵南极大陆。由于地球上主要山系的布局，注入太平洋河流的水量仅占全世界河流注入海洋总水量的 1/7。太平洋又以以东经 160° 为界，分东、西太平洋。

1.2 生态环境概述

在太平洋的不同水域区域，其环境因素有很大的差别。主要分为水层部分和海底部分。水层部分指太平洋的整个水体，海底部分指其整个海底，它们各自又可分成不同的环境区域。水层部分在水平方向上可分为浅海区和大洋区。浅海区是大陆架上的水体，平均深度一般在 200m 以下，但是其宽度变化很大，大约平均为 80km。浅海区由于受大陆的影响，其化学、水文、物理等要素相比较大洋区来说比较复杂易变^[1]。

大洋区(oceanic zone)一般指大陆架边缘以外的水体部分，与大陆架上方的水体相互连通。大洋区是整个海洋的主体。大陆架边缘水体的深度一般为 200 m，所以一般将深度超过 200m 以上全部水域称为深海(deep sea)。大洋区是地球上最大的生态区，相对于近岸浅海区而言，大洋区的环境是相对稳定的，其理化环境条件比浅海区较为

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库